

**Metode uji residu antibiotik secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada ikan dan udang-  
Bagian 3: *Chloramphenicol* (CAP)**





© BSN 2010

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan .....	3
5 Bahan .....	3
6 Prosedur kerja .....	3
7 Perhitungan hasil.....	4
8 Pengendalian mutu.....	5
Lampiran A (normatif) Pembuatan larutan.....	6
Lampiran B (normatif) Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis CAP.....	7
Lampiran C (normatif) Posisi standar CAP dan contoh pada wells dan kurva kalibrasi standar CAP .....	8
Bibliografi .....	9
Gambar B.1 - Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis CAP .....	7
Gambar C.1 - Kurva kalibrasi standar CAP .....	8
Tabel C.1 – Susunan standar CAP dan contoh pada well.....	8



## Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas, dan memberikan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Metode uji residu antibiotik secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 3: *Chloramphenicol* (CAP).

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya. Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus SPT 65-05-S2 Perikanan Budidaya pada tanggal 14 September 2009 di Bandung, dihadiri oleh anggota subpanitia teknis, wakil-wakil dari unsur pemerintah, produsen, konsumen, pembudidaya, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya serta telah memperhatikan

1. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep. 01/Men/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.
5. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.01/Men/2007 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
6. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.02/Men/2007 tentang Monitoring Residu Obat, Bahan Kimia, Bahan Biologis dan Pencemaran Pada Pembudidayaan Ikan.
7. Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. 07/DPB/HK.150.154/S4/VII/2007 tentang Batas Maksimum Residu Obat Ikan, Peptisida dan Kontaminan Pada Bahan Makanan Yang Berasal Dari Ikan.
8. Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. No. 06/DPB/HK.150/S4/VII/2007 tentang Pedoman Pelaksanaan Monitoring Residu Obat, Bahan Kimia, Bahan Biologi.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 22 Desember 2009 sampai dengan 22 Pebruari 2010 dengan hasil akhir RASNI.



## Metode uji residu antibiotik secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 3: *Chloramphenicol* (CAP)

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan prosedur pengujian residu antibiotik *Chloramphenicol* (CAP) pada ikan dan udang dengan metode *enzyme linked immunoassay* (ELISA).

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **absorbansi**

penyerapan cahaya oleh partikel dalam suatu larutan dalam sistem optik pada ELISA reader

#### 2.2

##### **antibiotik**

zat kimia dengan sifat antimikroba, dihasilkan oleh mikroorganisme, tumbuhan, atau hewan yang lebih tinggi dan juga secara sintetik

#### 2.3

##### **antibodi**

molekul *immunoglobulin* yang mempunyai suatu rantai asam amino spesifik, hanya berinteraksi dengan antigen yang menginduksi sintesis molekul ini di dalam jaringan limfoid (khususnya sel plasma), atau dengan antigen yang erat hubungannya dengan antigen tersebut

#### 2.4

##### **antigen**

benda asing yang menyebabkan pembentukan antibodi bila dimasukkan ke dalam organisme. Antigen bisa berupa toksin dari bakteri, enzim, protein hewani dan nabati lain, atau sel nabati dan hewani

#### 2.5

##### **contoh ikan dan udang**

sejumlah kecil dari suatu populasi ikan/udang yang digunakan untuk pemeriksaan dan memenuhi persyaratan secara statistika

#### 2.6

##### ***chloramphenicol***

antibiotik yang diperoleh secara alami dari biakan bakteri *Streptomyces venezuelae* atau diproduksi secara sintesis yang aktif terhadap beberapa jenis bakteri antara lain bakteri aerobik dan anaerobik, *mycoplasma*, *organisme chlamydal*

#### 2.7

##### ***dilution factor***

faktor pengenceran yang diperoleh dari penambahan volume larutan pengencer

#### 2.8

##### **ekstraksi**

proses pemisahan senyawa diantara dua fase zat yang tidak bercampur



**2.9**

**enzim**

protein yang bertindak sebagai katalis biologis berfungsi mempercepat reaksi kimia di dalam jaringan organisme

**2.10**

**enzyme linked immunoassay (ELISA)**

teknik biokimia yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur suatu antibodi maupun antigen pada suatu contoh daging dari ikan/udang

**2.11**

**evaporasi**

proses penguapan yaitu proses perubahan molekul zat cair menjadi gas atau uap air

**2.12**

**extraction buffer**

larutan *buffer* untuk mengekstraksi senyawa analit dari contoh daging ikan/udang

**2.13**

**horse seradise peroxide (HRP) conjugated**

enzim pengikat

**2.14**

**inkubasi**

pemeliharaan organisme, campuran reaksi, dan semacamnya dalam lingkungan temperatur yang sesuai dan konstan selama kurun waktu tertentu agar tercapai hasil/akibat tertentu

**2.15**

**sentrifus**

alat untuk mengendapkan partikel dengan berat molekul rendah dengan cara pemutaran pada kecepatan tinggi

**2.16**

**stop buffer**

larutan *buffer* untuk menghentikan reaksi enzim

**2.17**

**TMB substrate**

larutan 3,3',5,5' Tetramethyl benzidine

**2.18**

**well**

lubang sumuran pada *microtiter plate* yang berisi antigen

**3 Prinsip**

Metode ini berdasarkan pengujian ELISA kompetitif untuk mendeteksi Chloramphenicol (CAP) yang terdapat pada ikan dan udang. Antibodi CAP dilapiskan pada lubang sumuran di microtiter plate. Selama analisa berlangsung, contoh ditambahkan bersamaan dengan CAP-horseradish peroxidase (CAP-HRP) conjugated. Residu CAP yang terdapat pada contoh akan berkompetisi memperebutkan antibodi CAP, dengan cara demikian akan melindungi CAP-HRP dari ikatan antibodi yang menempel pada sumuran. Setelah ditambahkan HRP



substrat (TMB) akan terbentuk perubahan warna. Intensitas warna yang dihasilkan akan berbanding terbalik dengan konsentrasi residu CAP di dalam contoh.

#### 4 Peralatan

- a) blender;
- b) erlenmeyer;
- c) evaporator (*nitrogen evaporator*);
- d) *freezer*;
- e) *micropipette* (20  $\mu$ l sampai dengan 200  $\mu$ l dan 200  $\mu$ l sampai dengan 1000  $\mu$ l);
- f) *micropipette multichannel* (50  $\mu$ l sampai dengan 300  $\mu$ l);
- g) *microtiter plate reader/ELISA reader* (450 nm/630 nm);
- h) *pipet volumetrik*;
- i) *reapeater pipet*;
- j) sentrifus;
- k) *shaker*;
- l) tabung sentrifus;
- m) timbangan analitik;
- n) *mini mixer*;
- o) *waterbath*.

#### 5 Bahan

##### 5.1 Bahan kimia

- a) akuabides;
- b) *ethyl acetate* G.R (*Grade Reagent*);
- c) *n-Hexane* G.R;
- d) *Nitrogen* H.P (*High Purity*).

##### 5.2 Bahan ELISA kits

- a) CAP *antibody coated plate*;
- b) CAP-HRP *conjugated*;
- c) 10x *sample extraction buffer*;
- d) 20x *wash solution*;
- e) larutan standar CAP (0; 0,05; 0,15; 0,5; 1,5; 4,5) ng/ml;
- f) *stop buffer*;
- g) TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine) *substrate*.

**CATATAN** Pembuatan larutan diuraikan dalam Lampiran A.

#### 6 Prosedur kerja

##### 6.1 Preparasi contoh daging ikan/udang

- a) lumatkan contoh ( $\pm$  250 gram) dengan blender hingga homogen;
- b) simpan contoh yang telah homogen pada wadah yang bersih dan tertutup;
- c) jika contoh tidak langsung diuji maka simpan dalam *freezer* sampai analisa akan dilakukan.



## 6.2 Ekstraksi

- Timbang 3 g homogenat contoh ke dalam tabung sentrifus dan tambahkan contoh dengan 6 ml *ethyl acetate*.
- Kocok campuran di atas selama 3 menit dengan menggunakan *mini mixer* dan sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 6000 rpm (4.025 g, r =10 cm) pada suhu (20 °C sampai dengan 25 °C).
- Pindahkan 4 ml *ethyl acetate* (lapisan atas) ke dalam tabung sentrifus baru, kemudian dievaporasi dengan menggunakan *nitrogen evaporator* pada suhu 60 °C
- Larutkan endapan (hasil evaporasi) yang telah mengering pada tabung sentrifus dengan 2 ml *n-Hexane*, kemudian tambahkan 1 ml 1x *sample extraction buffer* dan kocok selama 2 menit dengan menggunakan *mini mixer*.
- Sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm (4.025 g, r =10 cm) selama 10 menit pada suhu (20 °C sampai dengan 25 °C).
- Ambil 100 µl lapisan *buffer* (lapisan bawah) untuk analisa ELISA.

**CATATAN** Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh digambarkan pada Lampiran B.

## 6.3 Proses pengujian ELISA

- Masukkan 100 µl masing-masing larutan standar CAP ke dalam beberapa *well*, dengan susunan standar dari konsentrasi terendah sampai dengan konsentrasi tertinggi (Tabel C.1 ).
- Masukkan 100 µl masing-masing ekstrak contoh ke dalam *well* yang berbeda pula.
- Tambahkan 50 µl CAP-HRP *conjugated* dan campurkan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual selama 1 menit.
- Inkubasikan *microtiter plate* dalam kondisi tertutup selama 60 menit pada suhu (20 °C sampai dengan 25 °C).
- Buang cairan dari dalam *well* sampai benar-benar kering dengan cara mengetukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi oleh kertas tisu sehingga cairan dalam *well* keluar semua.
- Cuci *well* dengan 250 µl 1x *wash solution* sebanyak tiga kali.
- Setelah pencucian terakhir, balikkan *microtiter plate* dan ketukkan pada alas yang dilapisi oleh kertas tisu serta jangan biarkan *microtiter plate* mengering.
- Tambahkan 100 µl TMB *substrate* dan campurkan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara perlahan selama 1 menit.
- Inkubasikan *microtiter plate* dalam kondisi tertutup selama 20 menit pada suhu (20 °C sampai dengan 25 °C).
- Tambahkan 100 µl *stop buffer* untuk menghentikan reaksi enzim.
- Baca absorbansi setiap sumuran dengan *microtiter plate reader* (ELISA reader) pada panjang gelombang 450 nm dengan segera (tidak lebih dari 30 menit).

**CATATAN** Posisi standar CAP dan contoh pada *well* digambarkan pada Lampiran C.1.

## 7 Perhitungan hasil

- Kurva kalibrasi standar CAP dapat dibuat dari pembacaan % absorbansi setiap standar dengan konsentrasi standar dalam ng/ml pada kurva logaritma.

$$\frac{B}{B_0} \% = \frac{\text{Absorbansi standar atau contoh}}{\text{Absorbansi standar 0 ng/ml}} \times 100 \%$$

- Masukkan hasil pembacaan % absorbansi contoh ke dalam kurva kalibrasi standar (Gambar C.2).



- c) Nilai konsentrasi CAP pada contoh diperoleh dari persamaan logaritma standar dalam nilai ng/g setelah dikalikan *dilution factor*.
- d) Angka *dilution factor* diperoleh dari rasio bobot contoh dengan volume pelarut (3:6).

**CATATAN** Kurva kalibrasi standar CAP digambarkan pada Lampiran C.2.

## 8 Pengendalian mutu

Pengendalian mutu yang digunakan dengan persyaratan sebagai berikut:

- a) bahan kimia berkualitas murni (*Grade Reagent (G.R)*);
- b) alat gelas bebas kontaminasi;
- c) alat ukur yang telah dikalibrasi;
- d) menyimpan bahan ELISA kit pada lemari pendingin dengan suhu 2 °C sampai dengan 8 °C;
- e) kondisikan ELISA kit pada suhu kamar selama 30 menit sampai dengan 1 jam sebelum digunakan;
- f) gunakan bahan analisa sebelum batas waktu kedaluwarsa.





**Lampiran A**  
(normatif)  
**Pembuatan larutan**

**A.1 1x wash solution (larutan pencuci)**

Bahan :

- 20x wash solution (larutan pencuci)
- akuabides

Cara membuat:

Encerkan 20x wash solution (larutan pencuci) ke dalam akuabides dengan perbandingan 1 : 19

**A.2 1x sample extraction buffer**

Bahan :

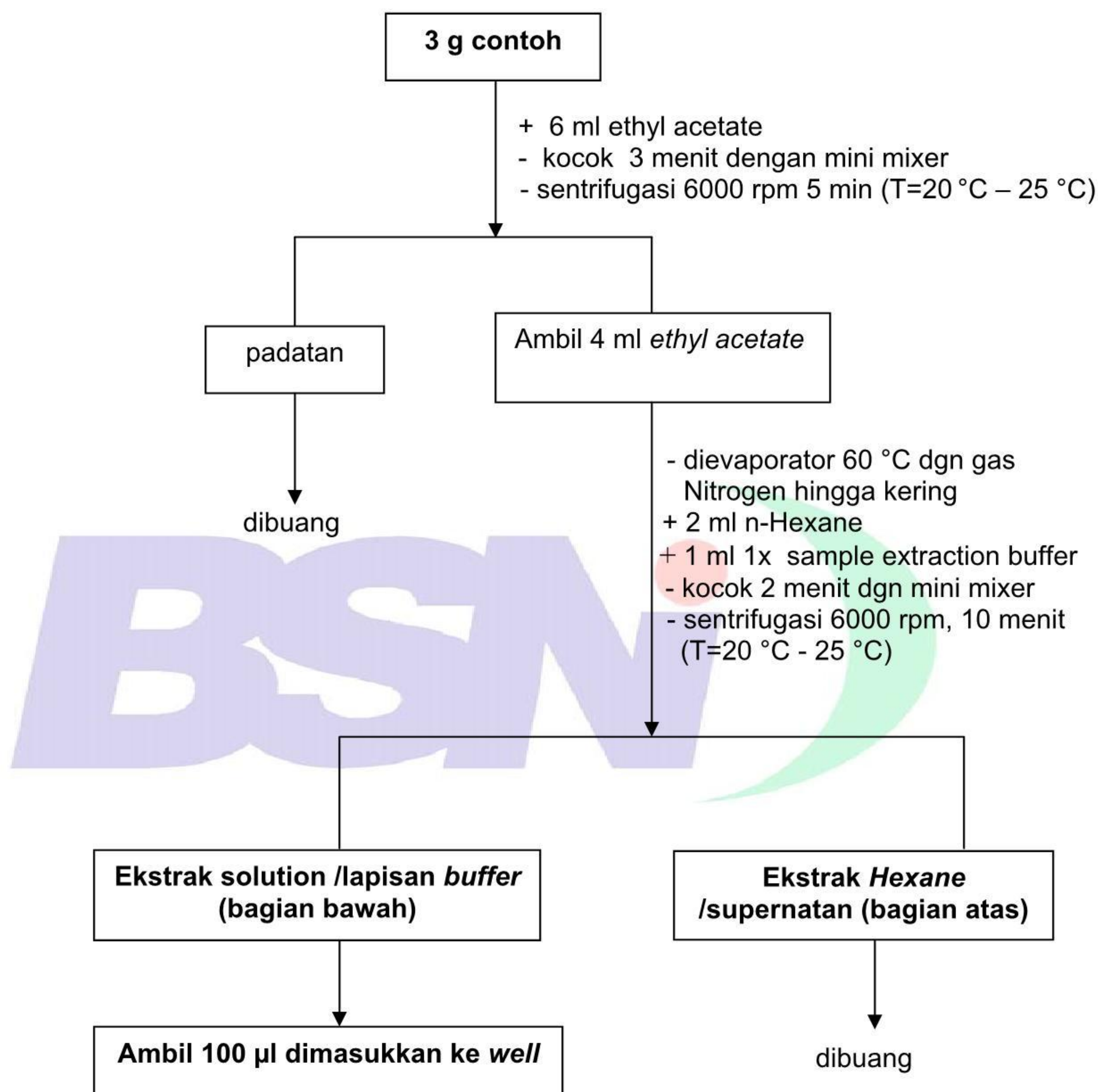
- 10x sample extraction buffer
- akuabides

Cara membuat:

Encerkan 10x sample extraction buffer dengan akuabides dengan perbandingan volume 1 : 9.



**Lampiran B**  
(normatif)  
**Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis CAP**



**Gambar B.1 - Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis CAP**



## Lampiran C (normatif)

### Posisi standar CAP dan contoh pada wells dan kurva kalibrasi standar CAP

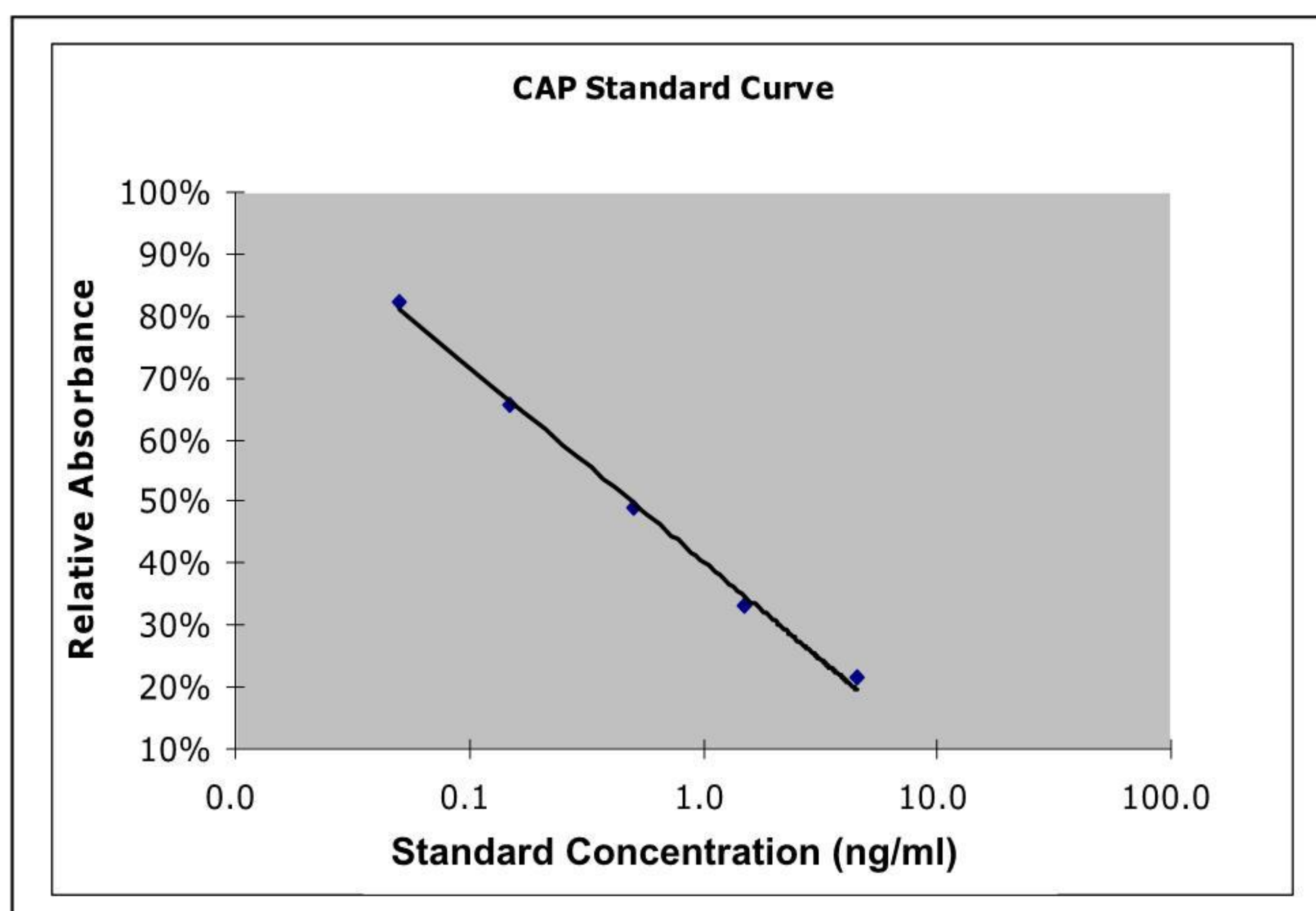
#### C.1 Posisi standar CAP dan contoh pada well

**Tabel C.1 – Susunan standar CAP dan contoh pada well**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S-0	S-1,5	C-3	C-7	C-11	C-15	C-19	C-23	C-27	C-31	C-35	C-39
B	S-0	S-1,6	C-3	C-7	C-11	C-15	C-19	C-23	C-27	C-31	C-35	C-39
C	S-0,05	S-6,4	C-4	C-8	C-12	C-16	C-20	C-24	C-28	C-32	C-36	C-40
D	S-0,05	S-6,4	C-4	C-8	C-12	C-16	C-20	C-24	C-28	C-32	C-36	C-40
E	S-0,15	C-1	C-5	C-9	C-13	C-17	C-21	C-25	C-29	C-33	C-37	C-41
F	S-0,15	C-1	C-5	C-9	C-13	C-17	C-21	C-25	C-29	C-33	C-37	C-41
G	S-0,5	C-2	C-6	C-10	C-14	C-18	C-22	C-26	C-30	C-34	C-38	C-42
H	S-0,5	C-2	C-6	C-10	C-14	C-18	C-22	C-26	C-30	C-34	C-38	C-42

Keterangan :  
 S : kode larutan standar CAP (0; 0,05; 0,15; 0,5; 1,5; 6,4) ng/ml;  
 C : kode larutan contoh (C1 – C42)  
 Lajur A-H : posisi well vertikal  
 Lajur 1-12 : posisi well horisontal

#### C.2 Kurva kalibrasi standar CAP



**Gambar C.1 - Kurva kalibrasi standar CAP**



## Bibliografi

Burgess, Graham, W. 1988. *Elisa Technology in Diagnosis and Research*. James Cook University of North Queensland.

Hadyana, Pudjaatmaka, A. 2002. *Kamus Kimia*. Balai Pustaka.

MaxSignal™ *Chloramphenicol (CAP) ELISA Test Kit Manual*.















**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.go.id](mailto:bsn@bsn.go.id)